

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2000-198799

(P2000-198799A)

(43) 公開日 平成12年7月18日 (2000.7.18)

(51) Int. Cl.⁷

識別記号

F I

テマコード (参考)

C 0 7 K 16/24

C 0 7 K 16/24

審査請求 未請求 請求項の数 4 O L (全 11 頁)

(21) 出願番号 特願平11-244595

(22) 出願日 平成11年8月31日 (1999.8.31)

(31) 優先権主張番号 特願平10-303858

(32) 優先日 平成10年10月26日 (1998.10.26)

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(71) 出願人 598147248

中田 光

東京都大田区東雪ヶ谷 3-27-8 デュリ

エ雪ヶ谷203号

(72) 発明者 中田 光

東京都大田区東雪ヶ谷 3-27-8 デュリ

エ雪ヶ谷203号

(74) 代理人 100068700

弁理士 有賀 三幸 (外4名)

(54) 【発明の名称】 抗GM-CSF自己抗体及びその測定試薬

(57) 【要約】

【解決手段】 下記性質を有する抗顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF) 自己抗体; 及びGM-CSFを用いた抗GM-CSF自己抗体の測定。

(1) 特発性肺胞蛋白症の気管支肺胞洗浄液又は血清より得られる。

(2) GM-CSFによるヒト末梢血単球及び腫瘍細胞株TF-1の増殖を抑制するが、IL-3によるヒト末梢血単球及び腫瘍細胞株TF-1の増殖を抑制しない。

【効果】 特発性肺胞蛋白症等の診断に有用。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記性質を有する抗顆粒球マクロファージコロニー刺激因子自己抗体。

(1) 特発性肺胞蛋白症患者の気管支肺胞洗浄液又は血清より得られる。

(2) 顆粒球マクロファージコロニー刺激因子によるヒト末梢血単球及び腫瘍細胞株TF-1の増殖を抑制するが、インターロイキン-3によるヒト末梢血単球及び腫瘍細胞株TF-1の増殖を抑制しない。

【請求項2】 顆粒球マクロファージコロニー刺激因子を含有することを特徴とするヒト検体中の請求項1記載の自己抗体測定試薬。

【請求項3】 特発性肺胞蛋白症診断薬である請求項2記載の測定試薬。

【請求項4】 ヒト検体に顆粒球マクロファージコロニー刺激因子又はその標識体を反応させ、当該反応生成物を測定することを特徴とするヒト検体中の請求項1記載の自己抗体の測定法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、医薬や診断薬として有用な、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（以下GM-CSFと略す）に特異的な自己抗体及びその測定試薬に関する。

【0002】

【従来の技術及び発明が解決しようとする課題】GM-CSFは、マクロファージ、リンパ球、上皮細胞、血管内皮細胞により産生される糖蛋白質であり、顆粒球、マクロファージの前駆細胞に作用し、それらの増殖と分化を促進するものである。また、GM-CSFは、抗原提示細胞を賦活化することにより生体防御に寄与している反面、アレルギー疾患や自己免疫疾患の局所においては炎症を激化していると考えられている。

【0003】かかるGM-CSFの作用をコントロールできれば、各種の炎症性疾患が治療できることから、GM-CSFに作用する物質の開発が熱望されている。

【0004】

【課題を解決するための手段】そこで本発明者は、進行性の呼吸困難を来す肺胞蛋白症に着目し、当該患者の気管支肺胞洗浄液中の成分について種々検討してきたところ、特発性肺胞蛋白症（以下、IPAPと略す）患者の気管支肺胞洗浄液（以下、BALFと略す）中に、GM-CSFと特異的に結合しGM-CSFの作用をコントロールする蛋白質を見出した。そしてさらに検討を続けたところ、全く意外にもこの蛋白質が抗GM-CSF自己抗体であり、GM-CSFを用いて当該自己抗体を測定すれば特発性肺胞蛋白症の診断が容易かつ確実にできることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0005】すなわち、本発明は、下記性質を有する抗GM-CSF自己抗体を提供するものである。

(1) 特発性肺胞蛋白症（IPAP）患者の気管支肺胞洗浄液（BALF）又は血清より得られる。

(2) GM-CSFによるヒト末梢血単球及び腫瘍細胞株TF-1の増殖を抑制するが、インターロイキン-3（IL-3）によるヒト末梢血単球及び腫瘍細胞株TF-1の増殖を抑制しない。また、本発明は、GM-CSFを含有することを特徴とするヒト検体中の抗GM-CSF自己抗体の測定試薬を提供するものである。さらにまた本発明は、ヒト検体にGM-CSF又はその標識体を反応させ、当該反応生成物を測定することを特徴とするヒト検体中の抗GM-CSF自己抗体の測定法を提供するものである。

【0006】

【発明の実施の形態】本発明の抗GM-CSF自己抗体は、特発性肺胞蛋白症（IPAP）患者の気管支洗浄液（BALF）又は血清から得られる。IPAP患者のBALFから、抗GM-CSF自己抗体を採取するには、このBALFから常法により蛋白画分を得、当該蛋白画分とGM-CSFを結合させて、結合する画分を採取すればよい。GM-CSFと結合する画分の検出には、GM-CSF及び標識マウス抗GM-CSF抗体を用いたELISAを採用するのが好ましい。抗GM-CSF自己抗体の精製は通常の蛋白精製手段と当該ELISAを組み合わせて行えばよく、例えばブタノール処理、陽イオン交換樹脂カラム（MonoSカラム）、陰イオン交換樹脂カラム（MonoQカラム）、ゲル濾過カラム（Superose12カラム）、陰イオン交換樹脂カラム（ResourceQカラム）及び陽イオン交換樹脂カラム（ResourceSカラム）と当該ELISAを組み合わせて、GM-CSFと結合する蛋白を採取すればよい。

【0007】本発明の抗GM-CSF自己抗体は、成人発症の肺胞蛋白症の90%以上を占めるIPAP患者のBALFからは得られるが、続発性肺胞蛋白症患者及び健康者のBALFからは得られない。

【0008】本発明の抗GM-CSF自己抗体は、GM-CSF存在下におけるヒト末梢血単球の増殖及び腫瘍細胞株TF-1の増殖を、いずれも抑制する。すなわち、ヒト末梢血単球及びTF-1は、いずれもGM-CSFの存在下で培養すると増殖することが知られているが、この培養系に本発明抗GM-CSF自己抗体を共存させるとこれらの増殖が抑制される。

【0009】一方、IL-3は機能的にはGM-CSFと同様とされており、ヒト末梢血単球及びTF-1は、いずれもIL-3の存在下で培養すると増殖する。しかし、この培養系に本発明抗GM-CSF自己抗体を共存させてもこれらの増殖は抑制されない。従って、本発明自己抗体はGM-CSFに特異的に結合するものであることが明らかである。

【0010】また、本発明自己抗体は、GM-CSFの

TF-1への結合を濃度依存的に阻害する。そして、このGM-CSFのTF-1への結合は、本発明自己抗体とTF-1を予め混合した後に、洗浄したTF-1を用いた試験では阻害されないことから、本発明自己抗体はTF-1や単球側に作用するのではなく、GM-CSF自体に作用して、それらの細胞の増殖を抑制していることがわかる。

【0011】さらに本発明自己抗体は、次の性質を有する。

(3) 本発明自己抗体は、GM-CSFとラット抗GM-CSFモノクローナル抗体との結合を阻害する。当該結合阻害実験は、例えばGM-CSFのELISA、例えばラット抗GM-CSFモノクローナル抗体を固相化し、これにGM-CSFと本発明自己抗体とを反応させ、次いで標識マウス抗GM-CSF抗体を反応させて、結合した標識量を測定することにより行われる。

【0012】(4) 本発明自己抗体は、トリプシン、リゾチーム又はプロテアーゼKにより分解されない。すなわち、本発明自己抗体は、トリプシン、リゾチーム又はプロテアーゼKを作用させた後でも、GM-CSFに対する結合活性を失わない。

【0013】(5) 本発明自己抗体は、100℃10分間処理、クロロホルム処理又はメタノール処理すると失活するが、55℃30分処理、n-ブタノール処理、EDTA処理及び2-メルカプトエタノール処理に対しては安定である。さらに、本発明自己抗体はpH4~11の範囲で30分処理しても安定である。

【0014】(6) 本発明自己抗体のドデシル硫酸ポリアクリルアミドゲル電気泳動法(SDS-PAGE)による分子量は、非還元条件で180kD、還元条件で57kDである。

【0015】(7) 本発明自己抗体は、イムノグロブリン分画中に存在する。また、アイソタイプはIgGである。

【0016】本発明の自己抗体はGM-CSFと特異的に結合し、GM-CSFの種々の作用をコントロールしていると考えられる。従って、本発明自己抗体は、GM-CSFの過剰産生が観察される炎症性疾患、特に皮膚アレルギー性疾患や喘息、慢性関節リュウマチ、移植後免疫反応、特発性間質性肺炎、特発性肺胞蛋白症などの治療薬としても利用できるが、ヒト検体中の本発明自己抗体を測定すればこれらの疾患、特に特発性肺胞蛋白症の診断が可能である。

【0017】ヒト検体中の本発明自己抗体を測定するには、GM-CSFを用いればよい。すなわち、ヒト検体にGM-CSF又はその標識体を反応させ、当該反応生成物を測定すればよい。当該測定法には、通常の免疫測定法をすべて用いることができる。すなわち、免疫比濁法及び標識化免疫測定法を用いることができる。標識化免疫測定法としては、ラジオイムノアッセイ、エンザイ

ムイムノアッセイ、蛍光イムノアッセイのいずれでもよい。ヒト検体としては、BALF、血漿、血清等が挙げられる。GM-CSFの標識体としては、 ^{125}I 、 ^3H 、 ^{14}C 等のラジオアイソトープ；パーオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ等の酵素；ビオチン、ジゴキシゲン等の化合物が挙げられる。

【0018】ヒト検体とGM-CSF又はその標識体との反応は、基本的にはヒト検体とGM-CSF又はその標識体とを接触させればよく、例えばヒト検体とGM-CSF又はその標識体を液体中で接触させるか、ヒト検体と固相化されたGM-CSF又はその標識体とを接触させる方法が挙げられる。

【0019】反応生成物の測定手段としては、反応生成物を直接測定する方法、反応生成物である自己抗体とGM-CSFの複合体を凝集させる方法(ラテックスビーズ凝集法、オクタロニー法など)、さらにヒト抗体に対する2次抗体を反応させる方法(例えばELISA法)などが挙げられる。また、この測定は、GM-CSFが自己抗体と反応することによるGM-CSFの活性の低下を測定することによっても行うことができる。GM-CSFの活性の低下は、TF-1細胞存在下に前記のGM-CSFと自己抗体との反応を行い、GM-CSFによるTF-1細胞の増殖率を測定すればよい。

【0020】かくしてヒト検体中の本発明自己抗体が測定できるが、特発性肺胞蛋白症患者血清中には、ほぼ全例本発明自己抗体が存在しており、その測定により特発性肺胞蛋白症の血清診断が感度と特異性ともに良くできる。

【0021】

【実施例】次に実施例を挙げて、本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれに何ら限定されるものではない。

【0022】実施例1(抗GM-CSF自己抗体の調製)

I. 材料及び方法

(1) 試薬

リコンビナントヒトGM-CSF(比活性 $2.25 \times 10^8 \text{U/mg}$)はキリンビール株式会社より提供された。リコンビナントIL-3はR&Dシステム社より購入した。ラット抗GM-CSFモノクローナル抗体は医科学研究所の北村助教教授より供与を受けた(Kitamura, T. et al, J. Cell. Physiol. 140:323-334)。ペルオキシダーゼラベル抗GM-CSFポリクローナル抗体はR&Dシステム社から購入した。放射性ヨード化リコンビナントヒトGM-CSFはNEN Life Science Products社から購入した。RPMI 1640培地は日本水株式会社より購入した。HiTrapS, HiTrapQ, Sephacryl 2000, ResourceQ, ResourceSカラムはファルマシアバイオテック社より購入した。

【0023】(2) 対象者

IPAP 1例、続発性2例、健常非喫煙者に気管支肺胞洗浄を施行した。肺胞蛋白症の診断は、BALFの生化学的解析と肺生検の病理組織診により行った。IPAP患者は病歴と現症を詳細に調べ、他に疾患がないことを確認した。2例の続発性例はいずれも慢性骨髄性白血病と診断されていた。全例から、記述されたインフォームドコンセントを得た。

【0024】(3) 気管支肺胞洗浄液上清 (BALF) 気管支肺胞洗浄液は1000×gにて15分遠心して、さらにその上清を40000×gで60分遠心し、上清を採取した(以後BALFと略す)。蛋白濃度は、Bardfordの方法により決定した。

【0025】(4) ヒト末梢血単球の分離 ヒト末梢血単球は健常者血液より、フィコールバック比重遠心法により得た。これをRPMI 1640培地に再浮遊させ、予め10%ヒトAB型非凝固血清でコートしたプラスチックフラスコに撒き、37℃5%CO₂環境下で15分培養し、非付着細胞はPBSにて5回洗浄することにより除去した。付着細胞は、0.05%トリプシン/PBSで10分処理した後、セルスクレーパー(住友ベークライト)を用いて収集した。得られた細胞は、形態と非特異的エステラーゼ染色により98%以上単球であると判定された。生細胞率はトリパンブルー色素除外法により求めた。

【0026】(5) TF-1細胞の培養 GM-CSF、IL-3、エリスロポエチン依存性の腫瘍細胞株TF-1は、RPMI 1640/10%FCS/10ng/ml GM-CSFの存在下で培養した。使用する前に細胞はPBSで4回洗浄し、GM-CSFを除いた。

【0027】(6) TF-1と単球の増殖測定 TF-1と単球の増殖測定はMTTアッセイにより行った。単球(1×10⁴/well)あるいはTF-1(2×10⁴/well)を96穴プレートで、様々な濃度のGM-CSF又はIL-3(0, 12.5, 25, 50, 100ng/ml)とIPAPあるいは健常者のBALF(0, 12.5, 25, 50, 100ng/ml)の存在下で3日間培養し、位相差顕微鏡下で観察後、MTT(3-[4, 5-ジメチルチアゾール-2-イル]-2, 5-ジフェニルテトラゾリウムブロミド; シグマ社) 5μg/mlを添加し、2時間培養後、生細胞によるホルマザン形成を100μlのイソプロパノール/HClに溶解し、OD550nmの吸光度を測定した。

【0028】(7) 放射性ヨードラベル化GM-CSFと受容体結合の測定

GM-CSFの受容体への結合はChiba, S. らの方法(Leukemia 4: 29-36)に従った。簡単には、TF-1(5×10⁵)をRPMI 1640培地1mlに浮遊させ、150pMの放射性ヨード化GM-CSFと様々な濃度のIPAPあるいは健常者のBALFとともに15℃

で90分反応させた。バックグラウンドの反応として同じ反応液の中にさらに過剰量の非放射性GM-CSFを加えたものも用意した。細胞浮遊液は250×gで5分遠心、洗浄を3回行い、γカウンターを用いて放射活性を測定した。

【0029】(8) 酵素抗体法(ELISA)によるGM-CSFと抗体との結合阻害の測定 GM-CSFと抗体との結合阻害の測定はGM-CSFのELISAにより行った。マイクロエライザープレートに、100μlの0.5μg/ml抗GM-CSFモノクローナル抗体(23B6)により一昼夜4℃でコートし、PBSで5回洗浄後、プレートはブロッキング試薬(スタビリコート、BSI社)を加え、室温にて1時間処理した。ブロッキング試薬を除去後、50μlの25ng/ml GM-CSFと50μlの様々な濃度(0~500μg/mg)のBALFの混合液を室温で2時間各ウエル中で反応させた。PBSで洗浄後、ペルオキシダーゼラベルされた抗ヒトGM-CSFポリクローナル抗体を各ウエルに加えて37℃で1時間反応させた。発色はTMB溶液(Color Reagents, R&D社)を用いて行った。450nmの吸光度はmicroplate spectrophotometer Model 3550(バイオラット社)を用いて測定した。TNF、IL6、MCP-1は市販のアッセイキットを用いて行った。パーセント阻害(%)は以下の式により求めた。

パーセント阻害(%) = $\left[\frac{1 - \text{検出されたGM-CSF (ng/ml)}}{25 \text{ (ng/ml)}} \right] \times 100$

【0030】(9) 架橋法による結合蛋白の検出

IPAPと健常者のBALF(500μg/ml)を放射性ヨードラベルされたGM-CSFと結合バッファー(25mM HEPES, pH7.4, 150mM NaCl, 10mM KCl, 10mM CaCl₂)中に90分間室温にて反応させた。コントロールとして100倍過剰量の非放射性GM-CSFを添加したものを同様に反応させた。架橋反応は300μMジスチンイミジルスベラート(DSS)の添加により、4℃15分間行った。反応は、消光バッファー(50mM Tris-HCl pH8.0, 15mM NaCl, 2mMEDTA)を1ml加えて終了させた。反応液はSDS-PAGEにかけ、ゲルを乾燥させた後、オートラジオグラフィーを施行した。

【0031】(10) IPAP患者BALFよりGM-CSF結合蛋白の精製

IPAP患者BALF400mlに同量の蒸留水飽和n-ブタノールを添加し、5分間激しく振とうし、10分間静置後、3000回転10分遠心し、水層を回収した。その操作を3回繰り返した後集めた水層を超純水に対し透析した後、凍結乾燥した。凍結乾燥した蛋白は20mM酢酸アンモニウムpH6.0に溶解後、HiTrapS 陽イオン交換カラムにかけ、0~0.5M NaClにて溶出した。GM-CSF結合活性をELISAで検出し、活性のあるフラクションを集め、20mM Tris HCl pH9.0に

対して透析し、HiTrap Q 陰イオン交換カラムにかけ、同様に溶出させ、得られた活性のあるフラクションを10mM 酢酸アンモニウムに対して透析後、凍結乾燥し、PBS/0.1% NP40に溶解後、Superose 12ゲル濾過カラムにかけた。上記と同様に溶出後、活性のあるフラクションを20mM Tris HCl pH9.0に対して透析後、Resource Qカラムにかけた。活性のあるフラクションを20mM 酢酸アンモニウムpH6.0に対して透析後、Resource S 陽イオン交換カラムにかけて同様に溶出後、活性のあるフラクションを回収した。各ステップの蛋白純度はSDS-PAGEにて検討した。

【0032】(11) アイソトープラベルされたGM-CSFを用いたウエストウエスタンブロッティングによるGM-CSF結合蛋白の検出

特発性肺胞蛋白症患者の肺胞洗浄液又は、血清を非還元状態で電気泳動し、ポリビニリデンフルオリド膜に転写。膜をアルブミン含有バッファーにてブロッキングしたのち、アイソトープラベルされたGM-CSFと反応させる。膜を洗浄後、オートラジオグラフィーにて検出する。

【0033】II. 結果

(1) GM-CSF依存的細胞増殖のIPAPのBALFによる抑制

1ng/mlのGM-CSFの存在下で培養した単球及びTF-1の増殖がIPAP患者のBALFにより抑制された。増殖抑制は、BALF濃度に依存的で、GM-CSFの代わりにIL-3を加えたときには見られなかった。11例のIPAP及び2例の続発例、10例の健康者で増殖抑制を調べたが、IPAPのみにこの効果が見られた(図1)。1ng/mlのGM-CSF存在下で培養した単球の生細胞率は100μg/mlのIPAPのBALFの存在下で5%以下であるのに対し、同量の健康者のBALFの存在下で95%以上であった。以上の結果は、IPAP患者のBALFはGM-CSFの生物活性を特異的に阻害することを示している。

【0034】(2) GM-CSFとTF-1細胞の結合のIPAPのBALFによる拮抗阻害

IPAPのBALFによるGM-CSFの生物活性の阻害がGM-CSFとその受容体の結合以前かあるいは結合後に起こることなのかを明らかにするために、放射性ヨードラベル化GM-CSFとTF-1細胞との結合がIPAPのBALFによって阻害されるかどうか調べた。図2に示すように、この結合はIPAPのBALFにより濃度依存的に阻害された。また、予めTF-1細胞をIPAPのBALFに浮遊させた後、よく洗浄して放射性ヨード化GM-CSFと反応させても、結合阻害が見られないことから、IPAPのBALFは受容体に作用して結合阻害を起こすのではなく、GM-CSF自体に作用して阻害することが示された。

【0035】(3) IPAPのBALFによるGM-C

SFの特異抗体への結合阻害

GM-CSFの特異的モノクローナル抗体(23B6)への結合はIPAPのBALFによって阻害された。図3に示すように、この阻害は11例のIPAPで観察されたが、2例の続発例、3例の健康者では見られなかった。IPAPのBALFはTNFα、IL6、MCP-1のそれぞれの特異抗体への結合は阻害しなかった。%阻害率はIPAPのBALFの濃度依存的に増加した。

【0036】(4) IPAPのBALF中のGM-CSF結合因子の存在

以上の結果から考えて、IPAPのBALFの中にGM-CSFに結合する因子が存在すると考えて、放射性ヨード化GM-CSFとIPAPのBALFを反応後、DSS(ジスクシンイミジル スペラート)を用いて化学的に架橋し、還元状態でSDS-PAGEしたところ、39kDと41kDに特異的なバンドが得られ(図4、レーンc)、健康者のBALFではこのバンドは得られなかった(図4、レーンb)。このバンドは過剰量の非放射性GM-CSFの存在下で放射性ヨード化GM-CSFとIPAPのBALFを反応させたときには著しく減弱したことから(図4、レーンd)、GM-CSFとの特異的な結合であると思われた。この結果より、IPAPのBALFの中にGM-CSFと結合する物質の存在が確認された。

【0037】(5) IPAPのBALF中GM-CSF結合蛋白の精製とその性質

IPAPのBALFはリン脂質に富むことから、脂質と蛋白を分離するためにBALFをn-ブタノールで抽出したところ、GM-CSF結合活性は水層に認められた。このフラクションをMono S, Mono Q, Superose 12, Resource Q, Resource S カラムの各ステップを経てSDS-PAGE上銀染色で分子量18万の単一のバンドを得た。この蛋白の性質を表1に示した。

【0038】

【表1】

100℃10分加熱	失 活
55℃30分加熱	安 定
クロロホルム、メタノール処理	失 活
n-ブタノール処理	安 定
トリプシン処理	安 定
プロテアーゼK処理	安 定
リゾチーム処理	安 定
EDTA処理	安 定
2-メルカプトエタノール処理	安 定
pH4 30分	安 定
pH11 30分	安 定
分子量(SDS-PAGE)	
還 元	57kD
非還元	180kD

【0039】(11) ウエストウエスタンブロッティングによる検出(10)で得た精製蛋白はGM-CSFに対して特異的に結合することがアイソトープラベルされたG

M-CSFを用いたウエストウエスタンブロッティングにより確認された。

【0040】実施例2

実施例1で得られたGM-CSF結合蛋白が、自己抗体であることを確認するために次の試験を行った。

(1) NH₂末端アミノ酸分析

精製蛋白を還元状態で電気泳動して得られた57kDと28kDの2種類の蛋白のうち、57kDの蛋白をNH₂末端アミノ酸分析したところ、NH₂末端20残基がヒトイムノグロブリンH鎖に100%一致した。

(2) 抗体であることの確認

特発性肺胞蛋白症患者の肺胞洗浄液からリコンビナントプロテインAを用いてイムノグロブリン成分を抽出すると、GM-CSF結合活性はイムノグロブリン分画に存在することを確認した。このことより、特発性肺胞蛋白症患者の肺胞洗浄液中に存在するGM-CSF結合蛋白は抗GM-CSF自己抗体であることが明らかになった。

(3) アイソタイプ決定

ELISA法を用いてこの自己抗体は主としてIgGであることを確認した。

【0041】実施例3 (血清中にも存在することの確認)

アイソトープラベルされたGM-CSFを用いたウエストウエスタンブロッティングにより、特発性肺胞蛋白症患者(5例)の血清中にも全例でこの抗GM-CSF自己抗体が存在することを確認した。

【0042】実施例4

¹²⁵I-GM-CSFを用いたウエストウエスタン法による抗GM-CSF自己抗体の検出:

(方法) 特発性肺胞蛋白症患者又は健康者の血清を總蛋白量として1mg/mlになるように希釈し、10%TCA(トリクロロ酢酸)を10分の1量加え、蛋白を沈殿させた後、2~15%グラディエントポリアクリルアミドゲル電気泳動(30mA定電流、約2時間)を行い、PVDF膜に転写する(12V定電圧で75分)。膜は10%酢酸:50%メタノールにて1分固定後、1%牛アルブミン/リン酸緩衝液中(pH7.2)に4℃で一昼夜放置後、0.25μCiの¹²⁵I-GM-CSF/リン酸緩衝液(pH7.2)の入ったビニール袋に入れ、室温で1時間放置する。膜を取り出し、0.1%Tween 20/リン酸緩衝液中で4回洗浄後、風乾し、オートラジオグラフィーを行う。

【0043】(結果) 図5~7に結果を示す。図5~7中の上段のカラムは蛋白電気泳動後に転写した膜をクマシーブルー染色で染めたもの、下のカラムは同じ膜に

¹²⁵I-GM-CSFを反応させたオートラジオグラフィーのパターンである。特発性肺胞蛋白症11例と続発性肺胞蛋白症2例(図5)、健康者20例(図6)、他の肺疾患15例(図7)を対象に行ったスクリーニング

では、特発性肺胞蛋白症の患者のみに分子量180kDの特異的なバンドが確認できた。

【0044】実施例5

ELISA法による抗GM-CSF自己抗体の測定:

(方法) リコンビナントGM-CSF(R&D社製)1μg/mlを96穴エライザープレート(NUNC社製)に50μlずつ撒き、カバーシールで封じた後、1昼夜4℃に放置する。プレートは、PBS/0.1%Tween 20にて5回洗浄後、各ウェルに1%BSA/PBS溶液200μlを入れ、室温で1時間ブロッキングする。この溶液を吸引廃棄後、希釈した患者血清又はコントロールの健康者血清50μlをウェルに入れ、さらに1時間室温で反応させる。抗GM-CSF自己抗体は、コートしたGM-CSFに結合する。PBS/0.1%Tween 溶液にて5回洗浄後、0.3μg/mlのperoxidase label抗ヒトIgGウサギ抗体(Dako社製)を50μl入れ、室温にて1時間反応後、再びプレートをPBS/0.1%Tweenで5回洗浄する。各ウェルに50μlのTMB溶液(SCYTEK社製)を入れ、15分反応後、50μlのSTOP溶液(SCYTEK社製)を添加し、反応を止める。各ウェルの450nmにおける吸光度をエライザーリーダーで測定する。

【0045】(結果) 図8に結果を示す。特発性肺胞蛋白症の患者血清のOD値は0.49~1.10と健康者0.12~0.16、続発性0.15~0.19、先天性0.13~0.14よりも有意(p<0.01)に高かった。GM-CSFはアルブミンなどの血清蛋白とも親和性があり、何らかの理由で、健康者の血清とも弱く反応して、低レベルのOD値を示しているが、これらのサンプルは、前述したウエストウエスタン法で180kDの抗体のバンドは検出できないことから、非特異的な反応と考えられる。

【0046】実施例6

受け身凝集法による抗GM-CSF自己抗体の測定:

(方法) GM-CSFをカップリングさせるためのビーズはPolybead Microparticles(Polysciences社)を用い、反応は、同社のグルタルアルデヒドキット(Cat.#19540)を用いた。キットの説明書に従ってビーズを活性化し、500μlの%ビーズ溶液とリコンビナントGM-CSF100μgを室温にて一昼夜反応させ、15000回転で6分遠心後、上清を除去し、0.2Mエタノールアミン溶液に懸濁させ、30分反応させた後、再び15000回転6分遠心、上清を除去し、キットに付属のBSA溶液を加えブロッキングを行う。この方法で約50%のGM-CSFがビーズにカップリングされる。最終的に0.05%のビーズ溶液50μlと300倍希釈した患者あるいは、健康者の血清10μlを96穴丸底プレート内で24時間反応させ、凝集の有無を肉眼的に判定する。

【0047】(結果) 結果を表2に示す。健康者40人

で38人が陰性だったのに対し、特発性肺胞蛋白症の患者血清は、25人中24人が凝集した。また、続発性4人と先天性2人の血清は全く凝集しなかった。

【0048】

【表2】

	ラテックス凝集反応	
	陽 性	陰 性
特発性肺胞蛋白症	24	1
特発性肺胞蛋白症以外	2	44
続発性肺胞蛋白症	0	4
先天性肺胞蛋白症	0	2
健常人	2	38

【0049】実施例7

TF-1細胞を用いたバイオアッセイによる抗GM-CSF自己抗体の測定：

(方法) この方法は、自己抗体そのものの存在を見るのではなく、自己抗体により中和されるGM-CSFの生物活性の減弱をTF-1細胞の増殖を指標として測る方法である。TF-1細胞は医科学研究所北村俊雄博士より供与された。この細胞はGM-CSF依存性に増殖する腫瘍細胞株である。培養は γ 線滅菌96穴平底プレートで行う。TF-1細胞1万個を1ng/mlのリコンビナントGM-CSFと0.25%患者あるいは健常者血清を含むRPMI 1640培地(10%子牛血清を含む)100ml中に懸濁させ、37℃、5%炭酸ガス存在下で4日間培養する。5mg/mlのMTT溶液を10mlずつ各ウェルに添加し、さらに3時間培養する。細胞に取り込まれたMTTを可溶化するため、0.04規定塩酸イソプロパノール溶液100mlを加え、色素をよく溶かした後、560nmの吸光度をエライザーリーダーを用いて測定する。

【0050】(結果) TF-1細胞は1ng/mlのGM-CSF存在下で非常によく増殖し、4日間の培養で細胞数が約4倍になる。特発性肺胞蛋白症の血清は抗GM-CSF自己抗体を含んでいることから、添加したGM-CSFの効果は中和され、細胞増殖は観察されなかつ

た。MTT試薬は細胞内に取り込まれると代謝され疎水性の色素に変化する。その色素の吸光度を測定したところ、図9に示すように特発性肺胞蛋白症の血清のOD値は0.37~0.69と、健常者血清1.3~1.4、続発性1.0~1.2、先天性0.9~1.2に比べて有意に低い値($p < 0.01$)を示した。

【0051】

【発明の効果】本発明の自己抗体は、生体中で種々の炎症性疾患に関与していることが知られているGM-CSFに対する自己抗体であり、これを測定すればこれらの炎症性疾患の診断が可能である。特に特発性肺胞蛋白症の血清診断が感度と特異性ともに良くできる。

【図面の簡単な説明】

【図1】BALF(100 μ g/ml)のTF-1細胞(2×10^5)の増殖に対する作用を示す図である。

【図2】GM-CSFとTF-1の結合に対するIPAPのBALFによる拮抗阻害作用を示す図である。

【図3】BALFによるGM-CSFの抗GM-CSFモノクローナル抗体への結合阻害を示す図である。

【図4】架橋剤を介してGM-CSFとIPAPのBALFを結合させた蛋白のSDS-PAGE結果を示す図である。レーンaは放射性ラベルGM-CSFのみ、レーンbは健常者BALFを用いた場合、レーンcはIPAPのBALFを用いた場合、レーンdは過剰量の非放射性GM-CSF存在下で放射性ラベルGM-CSFとIPAPのBALFを用いた場合を示す。

【図5】特発性肺胞蛋白症(1~11)及び続発性肺胞蛋白症(12、13)の血清と 125 I-GM-CSFとを用いたウエストウエスタン法の結果を示す図である。

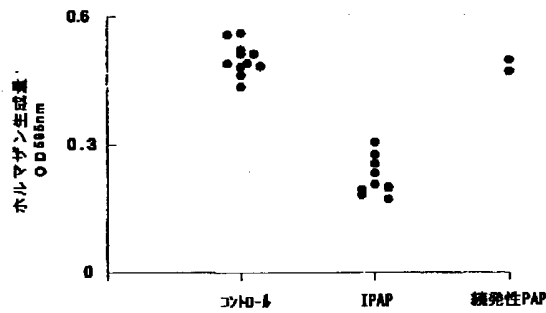
【図6】健常者(14~33)の血清と 125 I-GM-CSFとを用いたウエストウエスタン法の結果を示す図である。

【図7】肺胞症以外の肺疾患患者の血清(34~46)と 125 I-GM-CSFとを用いたウエストウエスタン法の結果を示す図である。

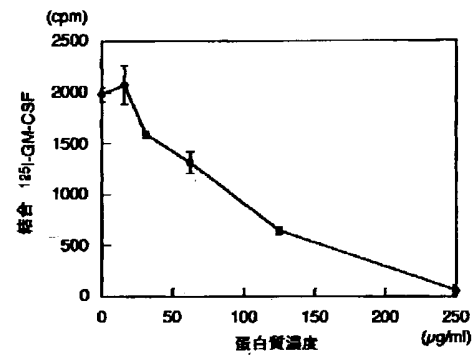
【図8】ELISA法による患者及び健常者血清中の抗GM-CSF自己抗体の測定結果を示す図である。

【図9】TF-1細胞を用いたバイオアッセイによる患者及び健常者血清中の抗GM-CSF自己抗体の測定結果を示す図である。

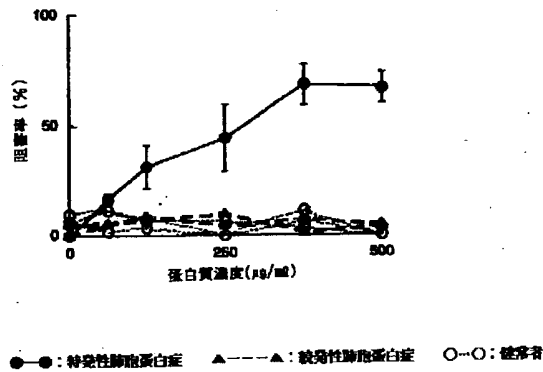
【図1】



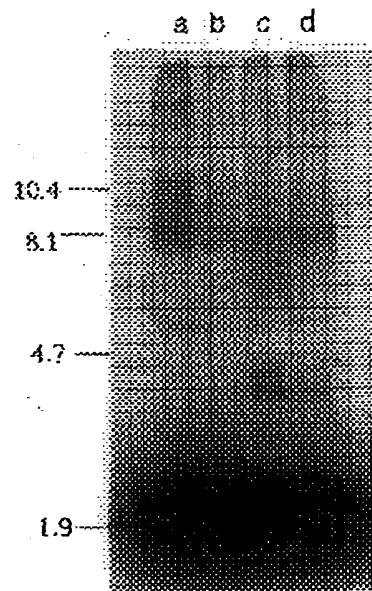
【図2】



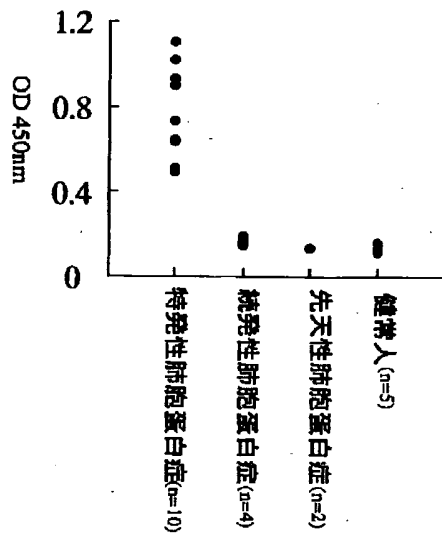
【図3】



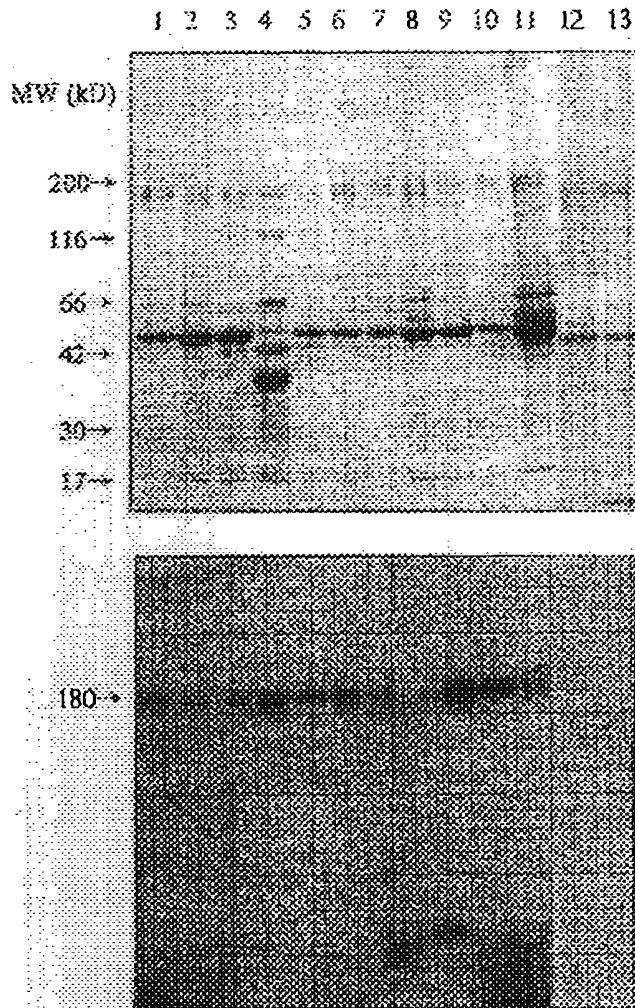
【図4】



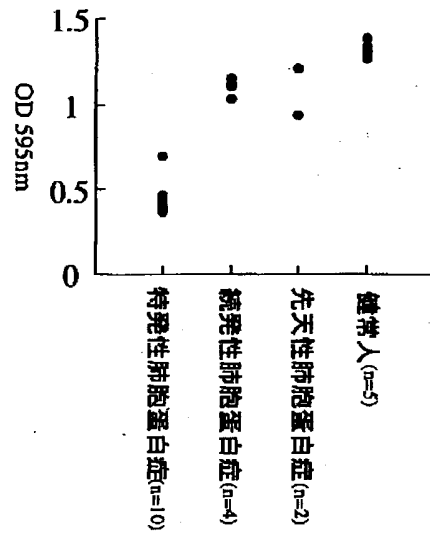
【図8】



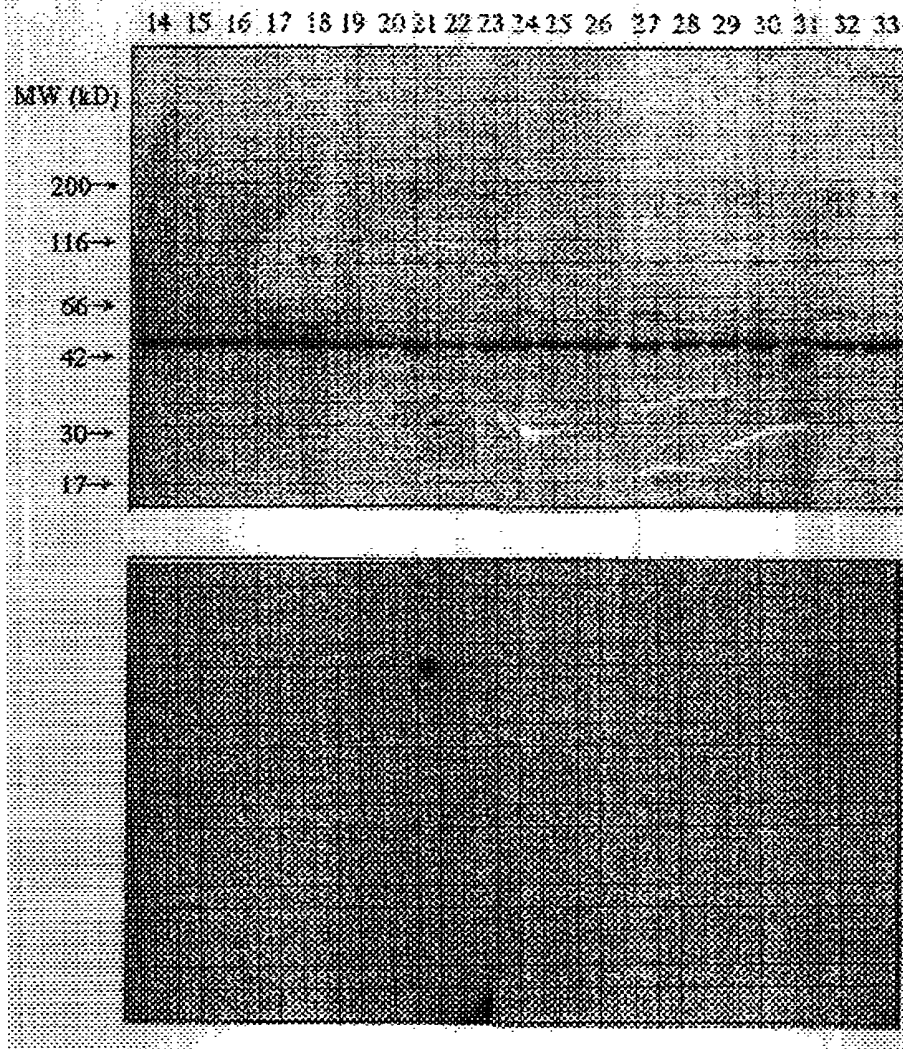
【図5】



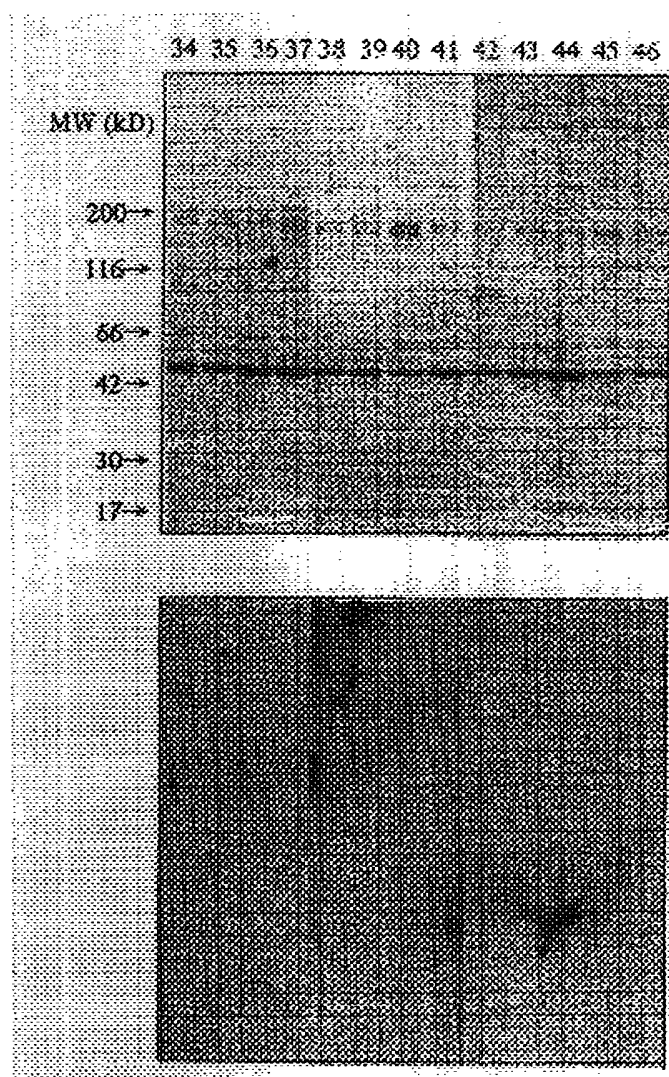
【図9】



【図6】



【図7】



PTO 04-2580

CY=JA DATE=20000718 KIND=A
PN=12-198799

ANTI-GM-CSF AUTOANTIBODY AND MEASURING REAGENT THEREFOR
[Ko GM-CSF jikokotai oyobi sono sokutei shiyaku]

Hikari Nakada

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE
Washington, D.C. April 2004

Translated by: FLS, Inc.

PUBLICATION COUNTRY	(19): JP
DOCUMENT NUMBER	(11): 2000-198799
DOCUMENT KIND	(12): A (13):
PUBLICATION DATE	(43): <u>20000718</u>
PUBLICATION DATE	(45):
APPLICATION NUMBER	(21): 11-244595
APPLICATION DATE	(22): 19990831
ADDITION TO	(61):
INTERNATIONAL CLASSIFICATION	(51): C07K 16/24
DOMESTIC CLASSIFICATION	(52):
PRIORITY COUNTRY	(33):
PRIORITY DATE	(32):
PRIORITY NUMBER	(31):
INVENTOR	(72): HIKARI NAKADA
APPLICANT	(71): HIKARI NAKADA
TITLE	(54): ANTI-GM-CSF AUTOANTIBODY AND MEASURING REAGENT THEREFOR
FOREIGN TITLE	[54A]: KO GM-CSF JIKOKOTAI OYOBI SONO SOKUTEI SHIYAKU

[Claims]

/2*

[Claim 1] An anti-granulocyte macrophage colony-stimulating factor autoantibody having the following characteristics: (1) the anti-granulocyte macrophage colony-stimulating factor autoantibody is obtained from the bronchoalveolar lavage fluid or blood serum of patients with idiopathic pulmonary alveolar proteinosis; and (2) the anti-granulocyte macrophage colony-stimulating factor is able to inhibit proliferation of human peripheral blood monocytes and the tumor cell strain TF-1, but the interleukin-3 is unable to inhibit the proliferation of human peripheral blood monocytes and the tumor cell strain TF-1.

[Claim 2] A reagent for measuring the autoantibody described in Claim 1 in a human specimen, wherein the reagent contains the anti-granulocyte macrophage colony-stimulating factor.

[Claim 3] The measuring reagent described in Claim 2, wherein the reagent is an idiopathic alveolar proteinosis diagnostic agent.

[Claim 4] A method for measuring the autoantibody described in Claim 1 in a human specimen, wherein the human specimen is reacted with the anti-granulocyte macrophage colony-stimulating factor or indicator thereof, and the reaction products are measured.

[Detailed Description of the Invention]

[0001] [Industrial Field of Application]

The present invention relates to a specific autoantibody for anti-granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and a

* Number in the margin indicates pagination in the foreign text.

measuring reagent therefor effective as a medicine and diagnostic agent.

[0002] [Prior Art and Problem Solved by the Invention]

GM-CSF is a glycoprotein produced by macrophages, lymphocytes, epitheliocytes, and vascular endotheliocytes. It acts on granulocytes and the precursor cells of macrophages and promotes propagation and division of these cells. On the other hand, GM-CSF protects the body by activating antigen-presenting cells which are believed to aggravate inflammations in patients with allergies and autoimmune diseases.

[0003] Because various inflammatory diseases could be treated if the action of GM-CSF could be controlled, the development of substances that act on GM-CSF is eagerly anticipated.

[0004] [Means of Solving the Problem]

While conducting extensive research on the components of bronchoalveolar lavage fluid in patients with the aim of understanding idiopathic pulmonary alveolar proteinosis leading to progressive dyspnea, the present inventors discovered a protein that bonds specifically with GM-CSF in the bronchoalveolar lavage fluid (BALF) of patients with idiopathic pulmonary alveolar proteinosis (IPAP) to control the activity of GM-CSF. During the course of subsequent research, this protein quite unexpectedly yielded an ant-GM-CSF autoantibody. The present inventors discovered that they could use GM-CSF to easily and reliably diagnose idiopathic pulmonary alveolar proteinosis by measuring the autoantibodies. The present invention is a product of these discoveries.

[0005] In other words, the present invention is an anti-granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) autoantibody having the following characteristics: (1) the anti-granulocyte macrophage colony-stimulating factor autoantibody is obtained from the bronchoalveolar lavage fluid (BALF) or blood serum of patients with idiopathic pulmonary alveolar proteinosis (IPAP); and (2) the GM-CSF is able to inhibit proliferation of human peripheral blood monocytes and the tumor cell strain TF-1, but the interleukin-3 (IL-3) is unable to inhibit the proliferation of human peripheral blood monocytes and the tumor cell strain TF-1. The present invention is also a reagent for measuring the GM-CSF autoantibody in a human specimen, wherein the reagent contains the GM-CSF. In addition, the present invention is a method for measuring the GM-CSF autoantibody in a human specimen, wherein the human specimen is reacted with the GM-CSF or indicator thereof, and the reaction products are measured.

[0006] [Embodiment of the Invention]

The anti-GM-CSF autoantibody of the present invention is obtained from the bronchoalveolar lavage fluid (BALF) or blood serum of patients with idiopathic pulmonary alveolar proteinosis (IPAP). In extracting the anti-GM-CSF autoantibody from BALF, the protein fraction is obtained from the BALF in the usually manner, the protein fraction is bonded with GM-CSF, and the bonded fraction is extracted. In detecting the fraction bonded to GM-CSF, ELISA should be utilized with GM-CSF and labeled mouse GM-CSF antibodies. The refinement of the anti-GM-CSF autoantibodies can be performed by combining ordinary

protein refining means with ELISA. For example, butanol processing, a cationic ion-exchange resin column (MonoS column), an anionic ion-exchange resin column (MonoQ column), a gel filtration column (Superrosell12 column), an anionic ion-exchange resin column (ResourceQ column) and a cationic ion-exchange resin column (ResourceS column) can be combined with ELISA to extract the proteins bonded to the GM-CSF.

[0007] The anti-GM-CSF autoantibody of the present invention is obtainable from the BALF of IPAP patients who account for more than 90% of adult-onset pulmonary aveolar proteinosis cases. It is not obtainable from the BALF of secondary PAP patients and healthy persons.

[0008] The anti-GM-CSF autoantibody of the present invention inhibits both the propagation of human peripheral blood monocytes and tumor cell strain TF-1 in the presence of GM-CSF. In other words, human peripheral blood monocytes and tumor cell strain TF-1 are known to propagate when cultivated in the presence of GM-CSF, but the propagation of both is inhibited when the anti-GM-CSF autoantibody of the present invention is also present in the cultivation system.

[0009] IL-3 is functionally equivalent to GM-CSF, and both human peripheral blood monocytes and tumor cell strain TF-1 propagate in the presence of IL-3. However, the propagation of neither is inhibited when the anti-GM-CSF autoantibody of the present invention is also present in the cultivation system. Therefore, the autoantibody of the present invention clearly bonds specifically to GM-CSF.

[0010] The autoantibody of the present invention prevents the bonding of GM-CSF to TF-1 only at certain concentrations. In other /3 words, the bonding of GM-CSF to TF-1 was not prevented during a test in which rinsed TF-1 was used after premixing the autoantibody of the present invention with the TF-1. Clearly, the autoantibody of the present invention acts not on the TF-1 or monocytes but on the GM-CSF itself to prevent propagation of both cells.

[0011] The autoantibody of the present invention also has the following characteristics.

(3) The autoantibody of the present invention inhibits bonding of GM-CSF to anti-GM-CSF monoclonal antibodies. In the bonding inhibitory testing, for example, GM-CSF ELISA such as rat anti-GM-CSF monoclonal antibodies were rendered in solid phase, the GM-CSF was reacted with the autoantibody of the present invention and then with tagged mouse anti-GM-CSF antibodies, and the bonded tagged amount was measured.

[0012] (4) The autoantibody of the present invention is not broken down by trypsin, lysozyme or protease K. In other words, the autoantibody of the present invention does not lose its ability to bond with GM-CSF even after interacting with trypsin, protease K or lysozyme.

[0013] (5) The autoantibody of the present invention is inactive after heat processing for 10 minutes at 100°C, chloroform processing or methanol processing, but stable after heat processing for 30 minutes at 55°C, n-butanol processing, EDTA processing or 2-

mercaptoethanol processing. In other words, the autoantibody of the present invention remains stable even after processing for 30 minutes at a pH between 4 and 11.

[0014] (6) The molecular weight of the autoantibody of the present invention according to sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) is 180 kD under non-reduction conditions and 57 kD under reduction conditions.

[0015] (7) The autoantibody of the present invention is in the immunoglobulin fraction. The isotype is also IgG.

[0016] The autoantibody of the present invention bonds specifically with GM-CSF to control, it is believed, the various actions of GM-CSF. Therefore, the autoantibody of the present invention can be used in the treatment of inflammatory diseases in which excessive production of GM-CSF is observed, such as cutaneous allergies, asthma, chronic rheumatoid arthritis, posttransplant immunoreactions, idiopathic pneumonitis and idiopathic pulmonary alveolar proteinosis. These diseases, particularly idiopathic pulmonary alveolar proteinosis, can be diagnosed by measuring the autoantibody of the present invention in the human specimen.

[0017] In measuring the autoantibody of the present invention, GM-CSF should be used. In other words, the autoantibody is reacted with GM-CSF or an indicator in the human specimen, and the reaction product is measured. The measuring method can be any immunological measuring method common in the art. For example, a turbidimetric immunoassay or labeled immunoassay can be used. For the labeled

immunoassay, a radioimmunoassay, enzyme immunoassay or phosphorescent immunoassay can be used. The human specimen can be BALF, blood plasma or blood serum. The GM-CSF label can be a radioisotope such as ^{125}I , ^3H or ^{14}C , an enzyme such as peroxidase or alkaliphosphatase, or a compound such as biotin or digoxigenin.

[0018] The reaction of the human specimen with the GM-CSF or label should be started by bringing the human specimen into direct contact with the GM-CSF or label, bringing the human specimen into contact with the GM-CSF or label in solution, or bringing the human specimen into contact with solid-phase GM-CSF or a label.

[0019] Examples of reaction product measuring means include measuring the reaction product directly, aggregating the autoantibody and GM-CSF complex in the reaction product (latex bead aggregation method, Ouchterlony method, or reacting a secondary antibody with the human specimen (ELISA method)). This measurement can also be performed by measuring the GM-CSF activity decrease due to the GM-CSF reaction with the autoantibody. The GM-CSF activity decrease can be measured by reacting the GM-CSF with the autoantibody in the presence of TF-1 cells and then measuring the rate of propagation for the TF-1 cells due to the GM-CSF.

[0020] The autoantibody of the present invention can be measured in any human specimen, but the presence of nearly all of the autoantibody of the present invention in the blood serum of patients with idiopathic pulmonary alveolar proteinosis when measured provides

a particularly sensitive and specific blood serum diagnoses of idiopathic pulmonary alveolar proteinosis.

[0021] [Working Examples]

The following is a detailed explanation of the present invention with reference to working examples. The present invention is by no means restricted to these working examples.

[0022] Working Example 1 (Anti-GM-CSF Autoantibody Preparation)

(1) Reagents

The recombinant GM-CSF (specific activity: 2.25×10^8 U/mg) was provided by Kirin Beer Co., Ltd. The recombinant IL-3 was purchased from R&D Systems Co., Ltd. The rat anti-GM-CSF monoclonal antibodies were provided by Associate Professor Kitamura at the Institute of Medical Science [University of Tokyo] (Kitamura, T. et al, J. Cell. Physiol. 140:323-334). The peroxidase-labeled anti-GM-CSF monoclonal antibodies were purchased from R&D Systems Co., Ltd. The radioactive iodide-treated recombinant human GM-CSF was purchased from NEN Life Science Products Co., Ltd. The RPMI 1640 cultures were purchased from Nissui Co., Ltd. The HiTrapS, HiTrapQ, Sephacryl 2000, ResourceQ and ResourceS columns were purchased from Pharmacia Biotech Co., Ltd.

[0023] (2) Subjects

Bronchoalveolar lavage fluid was taken from 11 IPAP patients, /4
2 secondary PAP patients and from healthy non-smokers. The pulmonary proteinosis diagnosis was performed using a biological analysis of the BALF and a histopathological diagnosis of lung specimens. The medical histories and current symptoms of IPAP patients were examined in

detail to make sure no other diseases were present. A chronic myelocytic leukemia examination was performed on both secondary PAP patients. Informed consent was obtained from all of the subjects in writing.

[0024] (3) Bronchoalveolar Lavage Fluid Supernatant (BALF)

The bronchoalveolar lavage fluid was centrifuged for 15 minutes at 1000 x g. The resulting supernatant was centrifuged for another 60 minutes at 40,000 x g, and the supernatant was extracted (hereinafter referred to as BALF). The protein concentration was measured using the Bardford method.

[0025] (4) Segregation of Human Peripheral Blood Monocytes

The human peripheral blood monocytes were obtained from the blood serum of healthy subjects using the Ficoll-Paque specific gravity centrifugation method. This was re-suspended in an RPMI 1640 culture, added to a plastic flask coated beforehand with 10% AB inactive blood serum, cultivated for 15 minutes at 37°C in a CO₂ environment, and the unattached cells were rinsed five times in PBS and removed. After treating the attached cells for 10 minutes in trypsin/PBS, they were collected using a cell scraper (Sumitomo Bakelite). The cells obtained in this manner were determined to be more than 98% monocyte from the form they took and from non-specific esterase dying.

[0026] (5) Cultivation of TF-1 Cells

GM-CSF, IL-3 and erythropoietin-dependent TF-1 tumor cells were cultivated in RPMI 1640 with 10% FCS and 10 ng/ml GM-CSF present.

Before use, the cells were rinsed four times in PBS and the GM-CSF was removed.

[0027] Measuring Cultivation of the TF-1 Cells and Monocytes

The propagation of TF-1 cells and monocytes was measured using an MTT assay. The monocytes (1×10^4 /well) and TF-1 cells (2×10^4 /well) were placed in a 96-hole plate and cultivated for three days in the presence of various concentrations of GM-CSF, IL-3 (0, 12.5, 25, 50, 100 ng/ml) and BALF (0, 12.5, 25, 50, 100ng/ml) from IPAP patients or healthy subjects. After an examination under a phase-contrast microscope, 5 μ g/ml MTT (3-[4,5-dimethylazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Sigma Co., Ltd.) was added. After two hours of cultivation, the formazan formations due to the live cells were dissolved in 100 μ l of isopropanol/HCl and the absorptivity at OD 550 nm was measured.

[0028] (7) Measuring the Receptor Bonding of Radioactive Iodide-Labeled GM-CSF

The bonding to the GM-CSF receptors was performed in accordance with the method of S. Chiba et al. (Leukemia 4:29-36). First TF-1 cells (5×10^5) were suspended in a 1 ml RPMI 1640 culture and reacted for 90 minutes at 15°C with 150 pM radioactive iodide-labeled GM-CSF and BALF from IPAP patients and healthy subjects at various concentrations. The background reaction was prepared by adding an excess amount of non-radioactive GM-CSF to the same reaction solution. The cell suspension was centrifuged for five minutes at 250 x g, rinsed three times, and measured for radioactivity using a γ counter.

[0029] (8) Measuring Bonding Inhibition of GM-CSF and Antibodies Using the Enzymatic Antibody Method (ELISA)

The bonding inhibition between GM-CSF and the antibody were measured using GM-CSF ELISA. A micro ELISA plate was coated with 100 µl of 0.5 µg/ml anti-GM-CSF monoclonal antibodies (23B6) and allowed to stand overnight at 4°C. After rinsing five times with PBS, a blocking reagent (Stabilicoat, BSI Co., Ltd.) was added and treatment was performed for one hour at room temperature. After removing the blocking reagent, a reaction was performed for two hours at room temperature in the various wells using a mixture of 50 µl 25 ng/ml GM-CSF and 50 µl of BALF at various concentrations (0-500 g/mg). After rinsing in PBS, peroxidase-labeled anti-human GM-CSF polyclonal antibodies were added to each well, and a reaction was performed for one hour at 37°C. Pigmentation was performed using a TMB solution (Color Reagents, R&D Co., Ltd.). The absorptivity at 450 nm was measured using microplate spectrophotometer Model 3550 (Biorat Co., Ltd.). TNF, IL6 and MCP-1 were performed using commercially available assay kits. The percent inhibited (%) was determined using the following formula.

$$\text{Percent Inhibited (\%)} = [1 - \text{Detected GM-CSF (ng/ml)} / 25 \text{ (ng/ml)}] \times 100$$

[0030] (9) Detection of Bonded Proteins Using the Cross-Linking Method

IPAP and healthy BALF (500 µg/ml) were reacted at room temperature for 90 minutes in a bonding buffer for radioactive iodide-labeled GM-CSF (25 mM HEPES, pH7.4, 150mM NaCl, 10mM KCl, 10mM CaCl₂).

In the control, the reaction was performed the same way except that 100 times the amount of non-radioactive GM-CSF was added. The cross-linking reaction was performed for 15 minutes at 4°C by adding 300 µM disuccinimidylsuberate (DSS). The reaction was stopped by adding 1 ml of quenching buffer (50mM Tris-HCl pH8.0, 15mM NaCl, 2mMEDTA). SDS-PAGE was performed on the reaction solution, the gel was dried, and autoradiography was performed.

[0031] (10) Refining GM-CSF Bonded Proteins From IPAP Patient BALF

Next, 400 ml of distilled water-saturated n-butanol was added to the same amount of IPAP BALF, and the mixture was shaken vigorously for five minutes. After being allowed to stand for 10 minutes, centrifugation was performed 3000 times in 10 minutes and the aqueous layer was removed. After performing this operation three times, dialysis was performed on the collected aqueous layer using ultra pure water and then the layer was freeze-dried. After dissolving the freeze-dried proteins in 20 mM ammonium acetate pH 6.0, it was added to a HiTrapS anion exchange column and eluted in 0-0.5M NaCl. The GM-CSF bonding activity was detected using ELISA, the active fraction was collected and dialysis was performed using 20 mM Tris HCl pH 9.0. This was added to a HiTrapQ anion exchange column, eluted in the /5 same manner, and dialysis was again performed on the active reaction using 10 mM ammonium acetate. The freeze-dried product was dissolved in a PBS/0.1% NP40 solution and added to a Superose12 gel filtration column. After elution, dialysis was performed on the active fraction using 20 mM TrisHCl pH 9.0 and the product was added to a ResourceQ

column. After dialysis was performed on the active fraction using 20 mM ammonium acetate pH 6.0, the product was added to a ResourceS anion exchange column. After elution, the active fraction was recovered. The protein purity at the various stages of this process was examined using SDS-PAGE.

[0032] (11) GM-CSF Bonded Protein Detection Using Far Western Blotting and Isotope-Labeled GM-CSF

Electrophoresis was performed in a non-reduction state on the BALF or blood serum of the IPAP patients and the product was transferred to a polyvinylidene fluoride film. After blocking the film in a buffer containing albumin, it was reacted with isotope-labeled GM-CSF. After rinsing the film, detection was performed using autoradiography.

[0033] II. Results

(1) Suppression of GM-CSF-Dependent Cell Propagation in IPAP BALF

The monocyte and TF-1 cell cultivation in the presence of 1 ng/ml GM-CSF was inhibited by IPAP BALF. The cultivation inhibition was dependent on the BALF concentration and was not observed when IL-3 was substituted for GM-CSF. The cultivation inhibition in 11 IPAP patients, 2 secondary PAP patients and 10 healthy subjects was examined. The effect was only observed in the IPAP (FIG 1). The monocyte propagation rate when cultivated in 1 ng/ml GM-CSF was 5% or less in the presence of 100 µg/ml IPAP BALF. In contrast, it was 95% or more in the presence of the BALF of healthy subjects. These results indicate that IPAP BALF specifically inhibits GM-CSF.

[0034] (2) Antagonistic Inhibition of GM-CSF and TF-1 Cell Bonding in IPAP BALF

In order to determine whether GM-CSF activity inhibition by IPAP BALF occurs before or after bonding of the GM-CSF to its receptors, the inhibition of radioactive iodide-labeled GM-CSF bonding to TF-1 cells by IPAP BALF was examined. As shown in FIG 2, the inhibition depends on the concentration of IPAP BALF. After suspending TF-1 cells in IPAP BALF, bonding inhibition was not observed even when thoroughly rinsed and reacted with radioactive iodide-labeled GM-CSF. The IPAP BALF acted on the receptors and not only inhibited bonding but also action on the GM-CSF itself.

[0035] (3) Antagonistic Inhibition of GM-CSF-Specific Antibodies in IPAP BALF

Bonding to a specific monoclonal antibody of GM-CSF (23B6) is inhibited by IPAP BALF. As shown in FIG 3, the inhibition was observed in the 11 IPAP patients but not observed in the two secondary PAP patients or the three healthy subjects. IPAP BALF does not inhibit bonding to the specific antibodies of $\text{TNF}\alpha$, IL6 or MCP-1. An increase in the inhibition rate (%) depends on the concentration of IPAP BALF.

[0036] (4) Presence of GM-CSF Bonding Factor in IPAP BALF

From these results, there appears to be a factor bonding to the GM-CSF in IPAP BALF. After reacting radioactive iodide-labeled GM-CSF with IPAP BALF, chemical cross-linking was performed using disuccinimidylsuberate (DSS). When reduction SDS-PAGE is performed,

specific bands were obtained in 39 kD and 41 kD (FIG 4, Lane c), but no bands were obtained in the BALF of the healthy subjects (FIG 4, Lane b). When radioactive iodide-labeled GM-CSF was reacted with IPAP BALF in the presence of an excess amount of non-radioactive GM-CSF, this is weakened significantly (FIG 4, Lane d) which means there is specific bonding to GM-CSF. As a result, the presence of a substance bonding to GM-CSF in IPAP BALF has been confirmed.

[0037] (5) Purification and Properties of GM-CSF-Bonded Proteins in IPAP BALF

Because IPAP BALF is rich in phosphatide, when the BALF was extracted using n-butanol to separate out the lipids from the proteins, the GM-CSF bonding activity was confirmed in the aqueous layer. The fractions were passed through the various stages in the Mono S, Mono Q, Superose 12, Resource Q and Resource S columns, and a single Mw 180,000 band was obtained using an SDS-PAGE silver dye.

[0038] [Table 1]

Heat For 10 Minutes at 100°C	Inactive
Heat For 30 Minutes at 55°C	Stable
Chloroform, Methanol Processing	Inactive
n-Butanol Processing	Stable
Trypsin Processing	Stable
Protease K Processing	Stable
Lysozyme Processing	Stable
EDTA Processing	Stable
2-Mercaptoethanol Processing	Stable
pH 4 30 Minutes	Stable
pH 11 30 Minutes	Stable
Molecular Weight (SDS-PAGE)	
Reduced	57 kD
Non-Reduced	180 kD

[0039] The refined proteins obtained in the detection process (10) using far western blotting (11) bonded specifically to GM-CSF.

This was confirmed in a far western blotting test using isotope-labeled GM-CSF.

/6

[0040] Working Example 2

The GM-CSF bonded proteins obtained in Working Example 1 were tested in the following manner to confirm the presence of the autoantibody.

(1) NH₂ Terminal Amino Acid Analysis

Of the two proteins obtained from reduction electrophoresis of the refined proteins, 57 kD and 28 kD, when protein 57 kD was analyzed using NH₂ terminal amino acid, there was a 100% match of the NH₂ terminal 20 residues with the human immunoglobulin H strand.

(2) Confirmation of Antibody

When the immunoglobulin component was extracted from IPAP BALF using recombinant protein A, the GM-CSF bonding activity was confirmed in the immunoglobulin fraction. It was clear from this that the GM-CSF bonded protein in the IPAP BALF was the GM-CSF autoantibody.

(3) Isotype Determination

The autoantibodies were confirmed as mainly IgG by the ELISA method.

[0041] Working Example 3 (Confirmation of Presence in Blood Serum)

The anti-GM-CSF autoantibody was confirmed in the blood serum of all IPAP patients (5 patients) using the far western blotting method with isotope-labeled GM-CSF.

[0042] Working Example 4

Anti-GM-CSF Autoantibody Detection Using Far Western Blotting and ^{125}I -GM-CSF

(Method) Blood serum from IPAP patients and healthy subjects was diluted to a total protein amount of 1 mg/mk, one part 10% TCA (trichloroacetic acid) was added over ten minutes to precipitate out the proteins, 2-15% gradient polyacetylamide gel electrophoresis (30 mA constant current, approximately 2 hours) was performed, and transfer to PVDF film was performed (75 minutes at 12 v constant voltage). After solidifying the film for one minute in 10% acetic acid and 50% methanol, the film was allowed to stand overnight at 4°C in a 1% bovine albumin/phosphoric acid buffer solution (pH 7.2). The next day, after adding the film to a vinyl bag containing 0.25 μCi ^{125}I -GM-CSF/phosphoric acid buffer solution (pH 7.2), it was allowed to stand for one hour at room temperature. The film was then removed, rinsed four times in 0.1% Tween 20/phosphoric acid buffer solution, and air dried. Finally, autoradiography was performed on the film.

[0043] (Results) The results are shown in FIG 5 through FIG 7. After performing protein electrophoresis in the upper level column in FIG 5 through FIG 7, the transferred film was dyed with Coomassie Brilliant Blue. In the lower column, the same film was reacted with ^{125}I -GM-CSF to obtain an autoradiography pattern. In screening performed on 11 IPAP patients, 2 secondary PAP patients (FIG 5), 20 healthy patients (FIG 6) and 15 patients with other lung diseases (FIG

7), specific bands with a molecular weight of 180 kD were confirmed only in the IPAP patients.

[0044] Working Example 5

Measurement of the Anti-GM-CSF Autoantibody Using the ELISA Method

(Method) First, 1 µg/ml of recombinant GM-CSF (R&D Co., Ltd.) was added 50 µl at a time to an ELISA plate with 96 wells (NUNC Co., Ltd.). After covering and sealing the plate, it was allowed to stand overnight at 4°C. After rinsing the plate five times in PBS/0.1% Tween 20, 200 µl of 1% BSA/PBS solution was added to the wells and blocking was performed for one hour at room temperature. After absorbing and discarding the liquid, 50 µl diluted patient serum and healthy subject serum as a control were added to the wells and the reaction was continued for another hour at room temperature. The anti-GM-CSF autoantibody was bonded to the GM-CSF. After rinsing the plate five times in PBS/0.1% Tween, 50 µl of 0.3 µg/ml peroxidase-labeled anti-human IgG rabbit antibodies (Dako Co., Ltd.) was added. After conducting a reaction for one hour at room temperature, the plate was again rinsed five times in PBS/0.1% Tween. After adding 50 µl of TMB solution (Scytek Co., Ltd) to each well and conducting a reaction for 15 minutes, 50 µl of STOP solution (Scytek Co., Ltd) was added to stop the reaction. Finally, the absorptivity at 450 nm for each well was measured using an ELISA reader.

[0045] (Results) The results are shown in FIG 8. The OD value was 0.49 to 1.10 for the IPAP serum, 0.12 to 0.16 for the healthy subject serum, 0.15 to 0.19 for the secondary PAP serum, and 0.13 to 0.14 for the congenital PAP serum. In other words, the values for the idiopathic pulmonary alveolar proteinosis serum were significantly higher ($p < 0.01$). GM-CSF has an affinity for serum albumin. For some reason, the reaction with the serum from the healthy subjects was weakened and low-level OD values were indicated. Because bands for 180 kD antibodies could not be detected in these samples using the far western blotting method, the reaction is believed to be non-specific.

[0046] Working Example 6

Measurement of the Anti-GM-CSF Autoantibody Using the Passive Condensation Method

(Method) The beads used to couple the GM-CSF were Polybead Microparticles (Polysciences Co., Ltd.). A glutalaldehyde kit (Cat. #1954) was used in the reaction. The beads were activated in accordance with the kit instruction manual, and 500 ml of % bead solution and 100 mg of recombinant GM-CSF were allowed to stand overnight at room temperature. After centrifugation 15,000 times in six minutes, the supernatant was extracted, suspended in a 0.2 M ethanol amine solution, and reacted for 30 minutes. After centrifugation 15,000 times in six minutes, the supernatant was extracted, the BSA solution from the kit was added, and blocking was performed. In this method, 50% of the GM-CSF was coupled. Finally, 50 ml of 0.05% bead solution and 10 ml of patient and healthy subject

serum diluted 300 times was added to a 96-hole round-bottomed plate, reacted for 24 hours, and observed with the naked eye for hemagglutination.

[0047] (Results) The results are shown in Table 2. Compared to the 38 of 40 healthy human subjects who were negative, the blood /7 serum in 24 of 25 idiopathic pulmonary alveolar proteinosis patients was hemagglutinated. The blood serum of the four secondary pulmonary alveolar proteinosis patients and the two congenital pulmonary alveolar proteinosis patients was free of hemagglutination.

[0048] [Table 2]

	Latex Agglutination Reaction	
	Positive	Negative
Idiopathic Pulmonary Alveolar Proteinosis	24	1
Non-Idiopathic Pulmonary Alveolar Proteinosis	2	44
Secondary Pulmonary Alveolar Proteinosis	0	4
Congenital Pulmonary Alveolar Proteinosis	0	2
Healthy Persons	2	38

[0049] Working Example 7

Measurement of the Anti-GM-CSF Autoantibodies Using a Bioassay with TF-1 Cells:

(Method) In this method, the autoantibody itself was not observed. Instead, TF-1 cell propagation in the weakened activity of the GM-CSF neutralized by the autoantibody was measured as an indicator. The TF-1 cells were provided by Dr. Toshihiro Kitamura at the Institute of Medical Science [University of Tokyo]. The cells were a tumor cell strain whose propagation depended on GM-CSF. The cultivation occurred in a 96-hole flat-bottomed plate sterilized using gamma radiation. Ten thousand TF-1 cells were suspended in a 100 ml RPMI 1640 culture

containing 1 ng/ml recombinant GM-CSF and 0.25% blood serum from the healthy subjects or the patients (and including 10% vituline serum). This was cultivated for four days at 37.5°C in the presence of carbon dioxide gas. Then, 10 ml of 5 mg/ml MTT solution was added to each one of the wells and cultivated for another three hours. Because the MTT was soluble and entered the cells, 100 ml of 0.04N hydrochloric acid isopropanol solution was added, the pigment was thoroughly dissolved, and the absorptivity at 560 nm measured using an ELISA reader.

[0050] (Results) The TF-1 cells propagated extremely well in the presence of 1 ng/ml GM-CSF. The number of cells after four days of cultivation had quadrupled. Because the IPAP blood serum contained the anti-GM-CSF autoantibody, the added GM-CSF effect was neutralized and cell propagation was not observed. When the MTT reagent had entered the cells, it was metabolized and changed into a hydrophobic pigment. When the absorptivity of the pigment was measured, as shown in FIG 9, the OD value was 0.37 to 0.69 for the IPAP serum, 1.3 to 1.4 for the healthy subject serum, 1.0 to 1.2 for the secondary PAP serum, and 0.9 to 1.2 for the congenital PAP serum. In other words, the values for the idiopathic pulmonary alveolar proteinosis serum were significantly lower ($p < 0.01$).

[0051] [Effect of the Invention]

The autoantibody of the present invention is an autoantibody for GM-CSF known to contribute to various inflammatory diseases in the human body. By measuring this autoantibody, these inflammatory diseases can be diagnosed. It can especially make blood serum

diagnoses of idiopathic pulmonary alveolar proteinosis more sensitive and specific.

[Brief Explanation of the Drawings]

[FIG 1] A diagram showing the action of TF-1 cells (2×10^5) propagating in BALF (100 $\mu\text{m}/\text{ml}$).

[FIG 2] A diagram of the IPAP antagonistic action on the bonding of GM-CSF and TF-1 in BALF.

[FIG 3] A diagram showing the inhibition of anti-GM-CSF monoclonal antibodies on GM-CSF in BALF.

[FIG 4] A diagram showing SDS-PAGE results for proteins bonded to GM-CSF in IPAP BALF via a cross-linking agent. Lane (a) shows the results for radiolabeled GM-CSF alone, Lane (b) the results from the BALF of healthy persons, Lane (c) the results from the BALF of IPAP patients, and Lane (d) the results from radiolabeled GM-CSF in IPAP BALF in the presence of a surplus amount of non-radiolabeled GM-CSF.

[FIG 5] A diagram showing the results from the far western method using the blood serum from IPAP patients (1-11), secondary PAP patients (12, 13) and ^{125}I -GM-CSF.

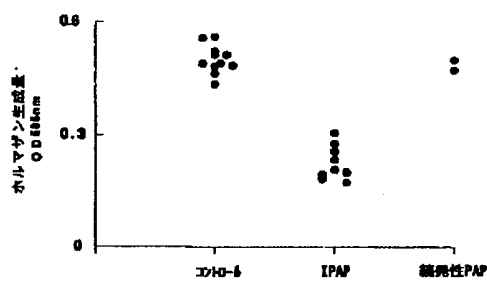
[FIG 6] A diagram showing the results from the far western method using the blood serum from healthy persons (14-33) and ^{125}I -GM-CSF.

[FIG 7] A diagram showing the results from the far western method using the blood serum from patients with lung diseases other than PAP (34-36) and ^{125}I -GM-CSF.

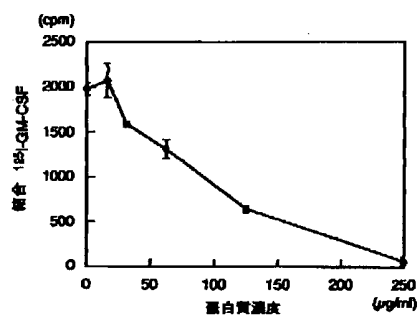
[FIG 8] A diagram showing the results of anti-GM-CSF autoantibody measurements in the blood serum of patents and healthy persons using ELISA.

[FIG 9] A diagram showing the results of anti-GM-CSF autoantibody measurements in the blood serum of patents and healthy persons using a bioassay with TF-1 cells.

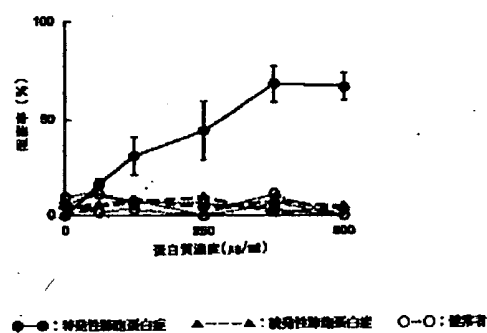
[Figure 1]



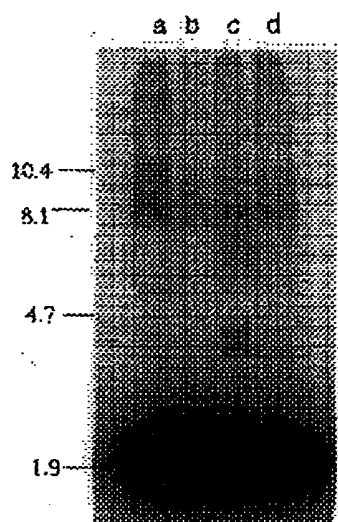
[Figure 2]



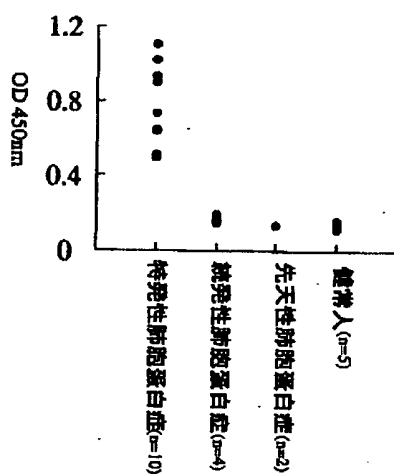
[Figure 3]



[Figure 4]



[Figure 8]



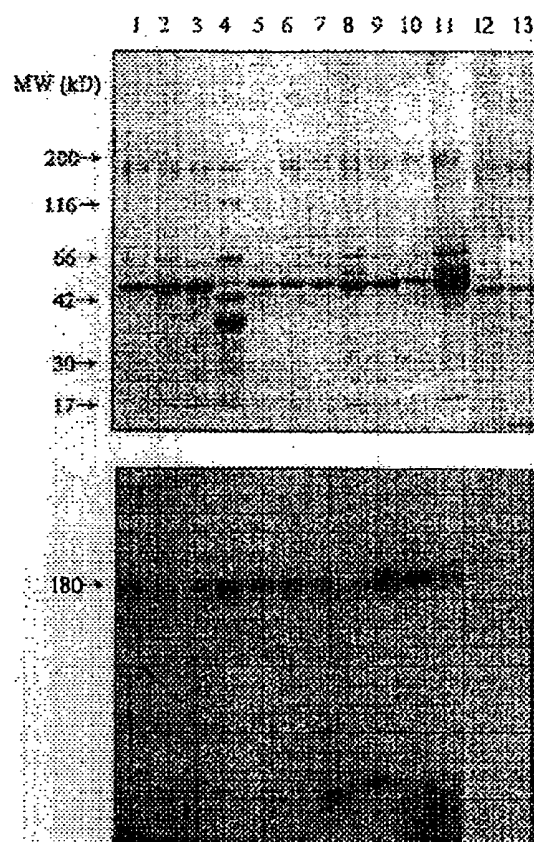
[FIG 1]
{x-axis} Control IPAP Secondary PAP
{y-axis} Amount of Hormones Generated

[FIG 2]
{x-axis} Protein Concentration
{y-axis} Bonding

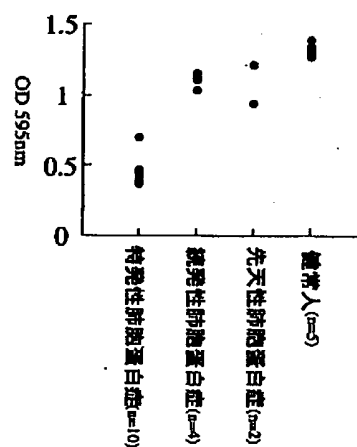
[FIG 3]
{x-axis} Protein Concentration
{y-axis} Inhibition Rate (%)

[FIG 8]
Healthy Persons (n=5)
Secondary Pulmonary Alveolar Proteinosis (n=2)
Congenital Pulmonary Alveolar Proteinosis (n=4)
Idiopathic Pulmonary Alveolar Proteinosis (n=10)

[Figure 5]



[Figure 9]



[FIG 9]

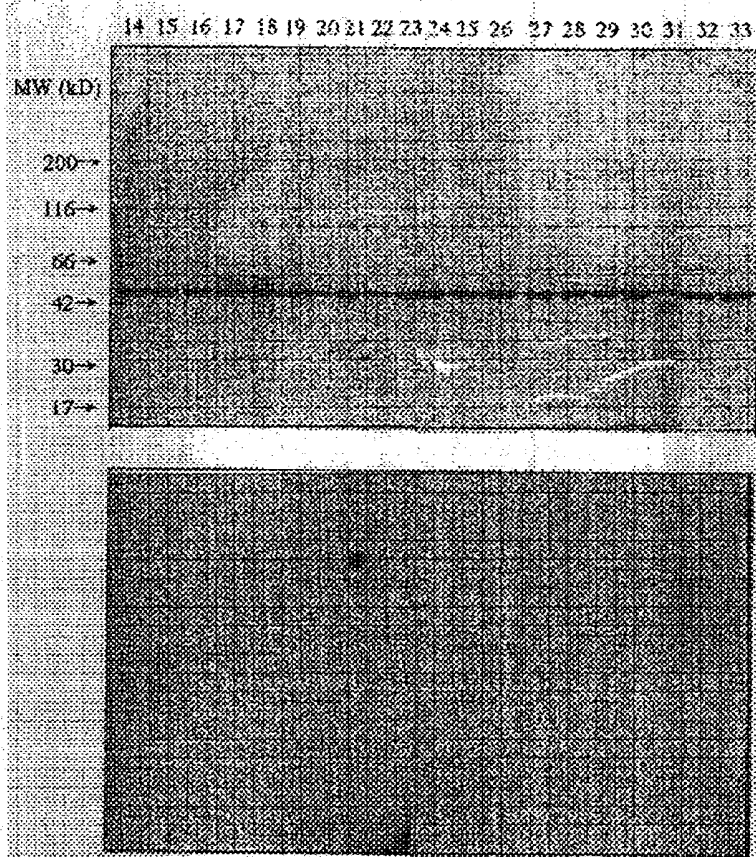
Healthy Persons (n=5)

Secondary Pulmonary Alveolar Proteinosis (n=2)

Congenital Pulmonary Alveolar Proteinosis (n=4)

Idiopathic Pulmonary Alveolar Proteinosis (n=10)

[Figure 6]



[Figure 7]

